

Emulsi air dalam lemak nabati



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	2
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	3
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji	4
9 Higiene.....	4
10 Pengemasan.....	4
11 Syarat penandaan	4
Lampiran A (normatif) Cara uji emulsi air dalam lemak nabati	5
Bibliografi	36
Tabel 1 - Syarat mutu emulsi air dalam lemak nabati.....	2

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Emulsi air dalam lemak nabati (fat spreads)* ini merupakan pemisahan dari SNI 01-3541-2002, *Margarin* menjadi SNI baru. Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri margarin.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang Pada Kemasan Pangan Dari Plastik.
8. Peraturan Menteri Perindustrian RI Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan Yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
9. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033/MENKES/PER/VII/2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
10. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04, Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 6 Desember 2012 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Badan Pengawas Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Mei 2013 sampai dengan tanggal 23 Agustus 2013 dengan hasil akhir RASNI.

Emulsi air dalam lemak nabati

1 Ruang lingkup

1.1 Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu dan cara uji emulsi air dalam lemak nabati.

1.2 Standar ini berlaku untuk emulsi air dalam lemak nabati yang kandungan lemaknya kurang dari 80 %.

1.3 Standar ini berlaku untuk bahan pangan industri (margarin kompon (*margarine compound*), campuran untuk roti (*bread compound*), bakeri kompon (*bakery compound*), margarin krim dan oles loyang (*pan release*) dan untuk konsumsi langsung (minarin (*minarine*) dan lemak oles (*fat spreads*)).

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 4831:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi koliform – Teknik Angka Paling Mungkin (APM)*.

CODEX STAN 256-2007, *Standard for fat spreads and blended spreads*.

SNI ISO 6887-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1 : aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran decimal*.

SNI ISO 6887-4, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*.

SNI ISO 6888-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1: Teknik menggunakan media Baird Parker Agar*.

SNI ISO 7218:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Persyaratan umum dan pedoman untuk pengujian mikrobiologi*.

SNI ISO 7251:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik angka paling mungkin (APM)*.

3 Istilah dan definisi

3.1

emulsi air dalam lemak (*fat spread*) nabati

produk emulsi lemak berbentuk padat atau semi padat atau cair dibuat dari minyak dan/atau lemak dan air dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain, dengan atau tanpa bahan tambahan pangan lain yang diizinkan

3.2**emulsi air dalam lemak nabati untuk bahan pangan industri**

produk emulsi lemak yang digunakan untuk keperluan industri

3.3**emulsi air dalam lemak nabati untuk konsumsi langsung**

produk emulsi lemak yang dapat langsung dimakan, tanpa diolah lebih lanjut dengan penambahan vitamin A dan vitamin D

4 Komposisi**4.1 Bahan baku**

Minyak dan/atau lemak nabati, dan air.

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk emulsi air dalam lemak nabati sesuai dengan ketentuan yang berlaku. Bila diperlukan, emulsi air dalam lemak nabati dapat pula ditambahkan lemak susu maksimum 3 % dari total lemak.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk emulsi air dalam lemak nabati sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu emulsi air dalam lemak nabati sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu emulsi air dalam lemak nabati

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Industri	Konsumsi langsung
1	Keadaan			
1.1	Bau	-	normal	normal
1.2	Rasa	-	normal	normal
2	Kadar lemak *	% (b/b)	10 - 79	10 – 79
3	Vitamin A	IU/100 g	-	2 500 - 3 500**
4	Vitamin D	IU/100 g	-	250 - 350**
5	Cemaran logam			
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,1	maks. 0,1
5.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2	maks. 0,2

Tabel 1- (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Industri	Konsumsi langsung
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40/250***	maks. 40/250***
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03	maks. 0,03
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40/250***	maks. 40/250***
6	Cemaran mikroba			
6.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^5	maks. 1×10^5
6.2	Koliform	APM/g	maks. 10	maks. 10
6.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3	< 3
6.4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/25 g	negatif/25 g
6.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^2	maks. 1×10^2
CATATAN: * untuk minarin 39 % - 41 %, untuk oles loyang \leq 60 %; ** di pabrik pada saat akhir proses produksi; *** untuk produk yang dikemas dalam kaleng.				

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk emulsi air dalam lemak nabati seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
- Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.3
- Cara uji vitamin A sesuai Lampiran A.4
- Cara uji vitamin D sesuai Lampiran A.5
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.6
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.6.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.6.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.6.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.7
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.8
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.8.1, SNI ISO 6887-1:2012 dan SNI ISO 6887-4
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.8.2
 - Cara uji Koliform sesuai dengan SNI ISO 4831:2012
 - Cara uji *E.coli* sesuai dengan SNI ISO 7251:2012,
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.8.3
 - Cara uji *S. aureus* sesuai dengan SNI ISO 6888-1:2012

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji emulsi air dalam lemak nabati

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh emulsi air dalam lemak nabati dan ambil contoh sebanyak 400 g secara aseptik, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh emulsi air dalam lemak nabati dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh emulsi air dalam lemak nabati dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) Cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) Lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2 Rasa**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “normal”; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.3 Kadar lemak**A.3.1 Prinsip**

Pengurangan contoh dengan kadar air dan residu.

A.3.2 Perhitungan kadar air dan bahan menguap**A.3.2.1 Prinsip**

Kadar air dan bahan menguap dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(130 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.3.2.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) desikator yang berisi desikan; dan
- d) pinggan alumunium bertutup diameter 50 mm, tinggi 20 mm.

A.3.2.3 Cara kerja

- a) Panaskan pinggan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(130 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama kurang lebih 30 menit dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) Masukkan 5 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) Panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu $(130 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 30 menit setelah suhu oven $(130 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- d) Tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- e) Lakukan pekerjaan c) dan d) hingga diperoleh bobot tetap; dan
- f) Hitung kadar air dan bahan menguap dalam contoh.

A.3.2.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air dan bahan menguap (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.2.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil kadar air dan bahan menguap. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka uji harus diulang kembali.

A.3.3 Perhitungan Kadar Residu

A.3.3.1 Prinsip

Kadar residu dihitung berdasarkan bagian yang tidak larut dalam pelarut organik

A.3.3.2 Peralatan Perhitungan Residu

- Neraca analitik dengan ketelitian 0,001 g;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C; dan
- Cawan *Gooch* atau cawan kaca masir dengan ukuran pori 16-40 µm.

A.3.3.3 Pereaksi

Eter absolut atau petroleum eter.

A.3.3.4 Cara kerja

- Timbang 1,5 sampai dengan 2,5 g contoh, keringkan dalam oven 100 °C (W);
- larutkan dengan 15 mL eter absolut atau petroleum eter;
- tuangkan ke dalam cawan *Gooch* atau cawan kaca masir yang sudah diketahui bobotnya;
- bilas lemak dari contoh dengan 100 mL pelarut di atas;
- tuangkan 25 mL pelarut ke dalam cawan tanpa disedot dengan vakum;
- keringkan cawan pada oven 100 °C dan timbang hingga bobot tetap (W_1); dan
- ulangi pencucian dengan 25 mL pelarut dan keringkan cawan pada oven hingga bobot tetap.

Tetapkan residu (r):

$$\text{Residu (\%)} = \frac{W_1}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot residu, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.4 Perhitungan Kadar Lemak

$$\text{Kadar lemak (\%)} = 100 - (a + r)$$

Keterangan :

a adalah air, dinyatakan dalam persen (%);

r adalah residu, dinyatakan dalam persen (%).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.4 Vitamin A

A.4.1 Prinsip

Standar dan contoh disabunkan dalam larutan basa etanol-air, dinetralkan, dan diencerkan, sehingga mengubah lemak menjadi asam lemak dan ester retinol menjadi retinol. Retinol dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 313 atau 328 nm.

A.4.2 Peralatan

- Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan pompa bertekanan tinggi dengan laju alir 1,0 mL / min sampai dengan 2,0 mL/min, injektor, kolom *reversed-phase* C18, 10 μ (4,6 x 250 mm) *Lichosperc* 100 RP-18, detektor ultraviolet (UV) dengan panjang gelombang 328 nm, *recorder*, *integrator*, siring berukuran 0 μ L sampai dengan 50 μ L atau *autosampler*, (sebagai alternatif bisa digunakan panjang gelombang 313 nm);
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- kondensor refluks;
- ultrasonik;
- Erlenmeyer berwarna gelap 125 mL;
- labu ukur 100 mL, 25 mL, dan 10 mL terkalibrasi;
- gelas ukur 50 mL terkalibrasi dan
- pipet ukur 5 mL, 2 mL, dan 1 mL terkalibrasi.

A.4.3 Pereaksi

- 1 Standar vitamin A asetat (ekivalen dengan 30 mg retinol/g minyak); atau
- 2 Retinil palmitat/vitamin A palmitat, semua dalam bentuk trans, bersertifikat Mintalah sertifikat analisis pada saat memesan. Apabila sertifikat pabrik tidak ada, atau kemurnian standar perlu diverifikasi, ujlilah kemurnian vitamin A palmitat sebagai berikut:
Larutkan 50 \pm 0,1 mg standar retinol palmitat dengan 2-propanol (*UV spectroscopy grade*) ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan sampai tanda garis. Encerkan 10 mL larutan standar ini menjadi 100 mL dengan 2-propanol (konsentrasi akhir kira-kira 10 mg/l). Ukurlah absorbansi maksimum yang diperoleh pada panjang gelombang 325-328 nm menggunakan kuvet 1 cm, dan 2-propanol sebagai blanko. Hitung kemurnian retinol palmitat sebagai berikut:

$$\% \text{ Kemurnian} = \frac{\text{ABS} \times 5 \times 10^6}{960 \times W} :$$

Keterangan:

ABS adalah maksimum absorbansi;
960 adalah absorbansi retinol palmitat murni (larutan 1% dalam kuvet 1 cm);
W adalah bobot bahan uji (standar yang diuji), dalam gram
5X10⁶ adalah faktor pengenceran gabungan, konversi ke larutan yang setara dengan 1% dan konversi ke %.

Simpan standar retinol palmitat pada suhu 0-4 °C.

- asam asetat glasial;
- metanol *HPLC grade*;
- etanol 95 %;

- e) tetrahidrofur (THF);
- f) heksana
- g) kristal asam pirogalat;
- h) fase gerak: campurkan 860 mL metanol dan 140 mL aquabides, kocok, (hilangkan gas menggunakan ultrasonik);
- i) larutan tetrahidrofur:etanol (50:50) sebanyak 1 L; campurkan 500 mL larutan tetrahidrofur (THF) dan 500 mL etanol 95%, kemudian kocok hingga homogen;
- j) larutan KOH 50%; secara perlahan masukkan 500 g pellet KOH ke dalam 500 mL air yang terdapat dalam Erlenmeyer 2 liter berdinding tebal (Peringatan: Larutan mengeluarkan panas pada saat melarutkan KOH; tambahkan 100 gram KOH secara bertahap ke dalam Erlenmeyer sambil didinginkan dengan air dingin (es). Goyangkan Erlenmeyer perlahan-lahan untuk menghindari disolusi KOH. Simpan larutan KOH dalam wadah gelas dengan tutup gabus

A.4.4. Cara kerja

A.4.4.1 Penyiapan larutan standar

A.4.4.1.1 Larutan baku standar vitamin A 15 µg/mL (50 IU/mL)

A.4.4.1.1.1 Menggunakan standar vitamin A asetat

- a) Timbang 50 mg vitamin A asetat dengan teliti ke dalam labu ukur berwarna gelap 100 mL;
- b) tambahkan sedikit aseton (kurang dari 3 mL) untuk membantu pelarutan;
- c) encerkan hingga tanda garis menggunakan etanol 95 %; dan
- d) simpan pada suhu 4 °C dalam ruang gelap (larutan ini stabil dalam 2 minggu).

A.4.4.1.1.2 Menggunakan retinil palmitat/vitamin A palmitat

- a) Timbang 55 mg retinil palmitat dengan teliti ke dalam labu ukur 100 mL berwarna gelap;
- b) tambahkan kira-kira 50 mg asam pirogalat, kemudian larutkan dan encerkan dengan heksana hingga tanda garis;
- c) pipet 5 mL larutan ke dalam labu ukur 100 mL berwarna gelap lainnya dan encerkan hingga tanda garis dengan etanol 95 %;
- d) simpan pada suhu 4 °C dalam ruang gelap, larutan ini stabil selama dua minggu.

A.4.4.1.1.3 Larutan deret standar vitamin A

- a) Pipet 5 mL larutan baku standar vitamin A 50 IU/mL ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 25 mL etanol 95% dan 50 mg asam pirogalat;
- b) pipet 2 mL larutan baku standar vitamin A 50 IU/mL ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 33 mL etanol 95% dan 50 mg asam pirogalat;
- c) pipet 0,5 mL larutan baku standar vitamin A 50 IU/mL ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 37,5 mL etanol 95% dan 50 mg asam pirogalat.
Tambahkan batu didih ke dalam setiap Erlenmeyer tersebut di atas.

A.4.4.2 Penyiapan contoh

- a) Timbang bahan uji sebanyak 2 g (W) (mengandung ± 50 µg vitamin A) ke dalam Erlenmeyer, kemudian tambahkan 40 mL etanol 95%;
- b) tambahkan asam pirogalat (± 50 mg) sebagai antioksidan dan beberapa butir batu didih;

- c) goyang semua Erlenmeyer yang berisi larutan deret standar vitamin A dan contoh untuk memastikan semua bahan tercampur merata.

A.4.4.3 Ekstraksi dan penyabunan

- Pipet 10 mL KOH 50% ke dalam setiap Erlenmeyer, alirkan gas N₂ sebelum dan saat refluks (pemanasan) dan segera letakkan Erlenmeyer di atas pemanas listrik, hubungkan dengan kondensor, refluks selama 45 menit sambil digoyang tiap 10 menit. Angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tutup dengan sumbat gabus, dan segera dinginkan sampai suhu kamar dengan menggunakan air dingin (air es);
- pipet 10 mL asam asetat glasial (gunakan "bulb") masukkan ke dalam setiap Erlenmeyer untuk menetralkan KOH;
- aduk rata dan biarkan dingin kembali sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan ini dengan teliti ke dalam labu ukur berwarna gelap 100 mL dan tambahkan THF-etanol 95% (50 : 50) sampai tanda tera dan tutup;
- bolak-balikkan labu sebanyak 10 kali. Biarkan labu selama 1 jam pada suhu kamar atau 1 malam di dalam lemari es untuk mengendapkan garam-garam dari asam lemak yang terbentuk selama proses penyabunan sehingga diperoleh hasil yang lebih baik. Dalam kasus tertentu, sentrifugasi dapat digunakan untuk mempercepat pengendapan;

A.4.4.4 Penetapan

- Nyalakan alat KCKT, biarkan stabil selama ± 30 menit, dengan fase gerak mengalir pada 1 mL/ menit;
- injeksikan larutan standar vitamin A yang telah melalui proses penyabunan;
- atur fase gerak untuk mendapatkan resolusi 1,5 atau lebih baik untuk bentuk cis dan trans. Semua trans retinol larut dalam waktu kira-kira 9 menit. Cis retinol akan larut sebagai sebuah *peak* kecil sebelum bentuk trans;
- injeksikan standar konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah;
- atur sensitivitas detektor untuk memberikan *peak* 50% sampai dengan 90% dari skala penuh untuk standar konsentrasi tinggi;
- ulangi injeksi standar sampai diperoleh puncak tertinggi;
- injeksikan larutan contoh diselingi dengan injeksi standar tiap 9 kali pengujian; dan
- jika retinol di dalam contoh uji melebihi *peak* standar konsentrasi tinggi sebanyak > 25%, larutkan contoh menggunakan larutan 10 mL KOH 50%, 40 mL etanol 96%, 10 mL asam asetat glasial, dan 40 mL THF- etanol 95% (50 : 50).

A.4.5 Perhitungan

Tentukan faktor respon untuk menggunakan standar vitamin A asetat dengan rumus:

$$\text{RFA} = \frac{\text{mg std} \times \text{mL std} \times \text{C std}}{\text{PkHt std} \times 10\,000}$$

Keterangan:

- mg std adalah bobot standar, dinyatakan dalam miligram (mg);
 mL std adalah volume injek, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 C std adalah konsentrasi standar vitamin A (sebagai retinol) dalam mg/g;
 PkHt std adalah *peak area* standar
 10 000 adalah faktor pengenceran gabungan

Menggunakan retinil palmitat/vitamin A palmitat:

Tetapkan faktor respon dengan rumus sebagai berikut:

$$RFA = \frac{mg_{std} \times mL_{std} \times kemurnian_{std} \times 0,5458}{P_k Ht_{std} \times 10000}$$

Keterangan:

kemurnian _{std}	adalah persen kemurnian yang terdapat pada sertifikat dari supplier atau dengan cara ditetapkan, dibagi 100;
mg _{std}	adalah bobot retinil palmitat, dinyatakan dalam miligram (mL);
P _k Ht _{std}	adalah tinggi atau area <i>peak</i> standar dari kromatogram;
mL _{std}	adalah standar kerja yang digunakan dalam prosedur, dinyatakan dalam mililiter (mL);
0,5458	adalah perbandingan bobot molekul retinol terhadap retinil palmitat;
200	adalah faktor pengenceran gabungan/konversi mg ke µg.

Nilai RFA standar dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi harus sesuai satu sama lain dengan relatif 3% karena respon detektor harus linier terhadap kisaran konsentrasi. Gunakan rata-rata nilai RFA yang dihitung dari standar dengan konsentrasi tinggi, sedang dan rendah untuk menguji kuantitasi contoh.

Ukurlah tinggi atau area peak retinol (vitamin A) dalam ekstrak contoh. Isomer 13-cis retinol mungkin terkandung dalam beberapa contoh. Ukurlah peak 13-cis. Kalikan tinggi atau area peak 13-cis retinol dengan 1,08 (sebagai kompensasi terhadap perbedaan absorbansi yang dibandingkan dengan isomer trans).

Tambahkan tinggi atau area peak 13-cis isomer yang telah dikoreksi tersebut pada semua isomer trans guna mendapatkan total tinggi atau area peak contoh.

Hitunglah konsentrasi vitamin A (dalam µg/g sebagai retinol) dengan menggunakan rumus sebagai berikut

$$\text{Vitamin A (}\mu\text{g/g) sebagai retinol} = \frac{RF_A \times PkHT_{sp} \times fp}{w}$$

Keterangan:

RF _A	adalah faktor respon;
PkHT _{sp}	adalah luas area contoh;
fp	adalah faktor pengenceran
w	adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

Sebagai alternatif, dapat juga digunakan kalibrasi 3 tingkatan menggunakan polinomial orde nol.

A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kandungan vitamin A. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Vitamin D

A.5.1 Prinsip

Setelah penambahan standar internal vitamin D₂ dan hidrolisis basa, vitamin D₃ diekstrak dengan n-heptana. Fraksi yang mengandung vitamin D₂/D₃ dipisahkan dengan kromatografi

cair fase normal. Setelah penguapan dan pengenceran dalam asetonitril-metanol, vitamin D₃ ditetapkan dengan cair fase terbalik (*reversed phase*) dengan detektor UV pada panjang gelombang 265 nm.

A.5.2 Peralatan

- Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor UV, integrator, Kolom *Lichosperc* 100 RP-18, kecepatan alir : 1,0 mL/min, siring 50 µ; Volume injek Vitamin D 20 µl (sesuai kebutuhan); Panjang gelombang-vitamin D : 265 nm;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Rotary evaporator*;
- Magnetik *stirrer*;
- Labu pemisah/labu kocok 500 mL;
- Labu didih berdasar bulat 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL terkalibrasi;
- Labu ukur 100 mL, 25 mL, dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Pipet ukur 5 mL, 2 mL, dan 1 mL terkalibrasi.

A.5.3 Pereaksi dan bahan-bahan

- Pelarut : metanol, n-heptan, *methyl-tert-butyl ether* (MTBE), sikloheksan, isopropanol dan asetonitril;
- Etanol absolut;
- Asam askorbat p.a;
- Etanol 40%;
larutkan 400 mL etanol absolut dengan air suling hingga 1 liter;
- Aquabides;
- KOH 50% (b/b);
larutkan 500 g KOH padat dalam 500 mL air suling;
- Larutan KOH 1 M;
larutkan 56 g KOH padat dalam aquabides hingga 1 liter;
- Larutan indikator Phenolftalein (PP) 1% (b/v);
larutkan 1 gram Phenolftalein dalam etanol, encerkan hingga 100 mL;
- BHT-2,6-Di-tert-butyl-methylphenol;
- Larutan sikloheksan-n-heptan (1:1);
larutkan 500 mL sikloheksana sampai dengan 1 liter menggunakan n-heptan;
- Fase gerak 1 : isopropanol 0,5% dengan MTBE 2% dalam sikloheksana-n-heptana
campurkan 5 mL isopropanol dan 20 mL MTBE dengan 1 liter sikloheksan-n-heptan (1:1),
Fase gerak 2 : isopropanol-n-heptana (20:80)
Encerkan 200 mL isopropanol sampai 1 liter menggunakan n-heptan
Fase gerak 3:metanol-asetonitril (20:80);
encerkan 200 mL metanol sampai 1 liter menggunakan asetonitril.

A.5.4 Cara Kerja

A.5.4.1 Penyiapan Standar

A.5.4.1.1 Vitamin D₂ ergocalciferol, kemurnian > 98 %

A.5.4.1.1.1 Larutan Stok Standar 1,0 mg/mL

- Timbang dengan teliti $\pm 0,1$ g vitamin D₂;
- larutkan dengan etanol;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan

- d) impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.5.4.1.1.2 Larutan Standar Kerja 20 µg/mL

- Pipet 2 mL larutan stok standar;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.5.4.1.1.3 Larutan Standar Internal 0,8 µg/mL

- Pipet 4 mL larutan standar kerja;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.5.4.1.1.4 Larutan standar internal 0,2 ug/ml

Pipet 1 mL larutan kerja ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan etanol sampai tanda garis.

A.5.4.1.2 Vitamin D₃ cholecalciferol, kemurnian > 98 %

A.5.4.1.2.1 Larutan Stok Standar 1,0 mg/mL

- Timbang dengan teliti $\pm 0,1$ g vitamin D₃;
- larutkan dengan etanol;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.5.4.1.2.2 Larutan Standar Kerja 20 µg/mL

- Pipet 2 mL larutan stok standar;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.5.4.1.2.3 Larutan Standar Internal 0,6 µg/mL

- Pipet 3 mL larutan standar kerja 20 µg/mL;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.5.4.1.3 Larutan Deret Standar Vitamin D₂ dan D₃ 5 µg/mL

- Pipet masing-masing 0,5 mL larutan stok standar Vitamin D₂ dan vitamin D₃ ke dalam labu alas bulat;
- uapkan sampai kering;
- larutkan residu di dalam sikloheksana-n-heptana (1:1) sampai 100 mL;
- Larutan deret standar vitamin D₂ dan D₃ 0,8 mg/mL:
Pipet masing-masing 2,0 mL larutan standar kerja, masukkan ke dalam labu ukur 50 mL, encerkan dengan asetonitril sampai tanda garis; dan
- Larutan standar induk akan stabil dalam gelap pada suhu -18 °C. Buang jika telah lewat 12 bulan atau jika kemurnian berkurang hingga <90%. Larutan standar harus disesuaikan dengan suhu ruang sebelum digunakan. Stabilitasnya tidak terpengaruhi oleh pendinginan berulang-ulang (-18 °C) dan pemanasan (suhu ruang) standar kerja dan standar internal harus dibuat sebulan sekali dan disimpan pada suhu 4 sampai dengan 8 °C.

A.5.4.1.4 Penetapan Konsentrasi Standar

Tetapkan konsentrasi standar vitamin D₂ dan D₃ setiap bulan dengan cara spektrofotometri dan kromatografi cair sebagai berikut:

a) Spektrofotometri

“Scan” larutan standar kerja vitamin D₂ 20 µg/ml dan vitamin D₃ 20 µg/ml dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm dengan blanko etanol. Catat absorbansi dan hitunglah konsentrasi (C) dengan menggunakan rumus:

$$C \text{ (mg/mL)} = \frac{A}{E} \times 1000 \times f_{LC}$$

Keterangan:

A	adalah absorbansi pada 265 nm;
E (1%, 1 cm)	adalah luas area contoh;
10000	adalah faktor konversi;
f _{LC}	adalah nilai ekonomis, ditetapkan dengan kromatografi cair.

b) Kromatografi Cair

Uapkan 1,0 mL larutan standar internal vitamin D₂ 0,8 mg/mL sampai hampir kering, kemudian larutkan residu dalam 3 mL fase gerak 3 (metanol:asetonitril, 20:80).

Analisis ekstrak tersebut dengan kromatografi cair fase terbalik dengan kondisi yang sama seperti analisis contoh

Hitunglah nilai kemurnian standar (f_{LC}) dengan menggunakan rumus berikut:

$$f_{LC} = \frac{A_D}{A_{tot}}$$

Keterangan:

A _D	adalah area peak D ₂ atau peak D ₃ ;
A _{tot}	adalah jumlah area semua peak vitamin D yang terdapat dalam kromatografi (kecuali peak pelarut dan gangguan)

Nilai kemurnian harus diantara 0,96 dan 1,0

A.5.4.2 Penyiapan Contoh

A.5.4.2.1 Penyabunan

- Timbang dengan teliti 5 sampai dengan 8 g contoh;
- masukkan ke dalam Erlenmeyer 300 mL bertutup asah;
- tambahkan 0,5 gram askorbat dan 50 mL larutan etanol;
- kemudian tambahkan 2 mL larutan internal standar vitamin D₂ dan 20 mL KOH 50%;
- hubungkan/pasang kondenser refluks pada Erlenmeyer, kemudian letakkan dalam penangas air (kira-kira 95 °C). Hidrolisis selama 30 menit dihitung sejak mendidih. Angkat erlenmeyer dari dalam penangas air;
- Tambah 50 mL air melalui kondenser, dan dinginkan sampai suhu ruang.

A.5.4.3 Ekstraksi

- Masukkan dengan teliti larutan hasil penyabunan ke dalam labu pemisah 500 mL;
- tambahkan 100 mL etanol 40%;
- tambah 75 mL n-heptan;
- kemudian kocok dengan cepat;

- e) biarkan larutan terpisah;
- f) pindahkan lapisan heptana ke dalam labu pemisah 250 mL;
- g) ulangi perlakuan ini sekali lagi dan gabungkan hasil ekstraknya;
- h) cuci larutan gabungan heptana hasil ekstrak dengan 50 mL KOH 1 M;
- i) kemudian cuci 2x dengan 50 mL etanol 40%;
- j) cuci dengan 50 mL akuades sampai larutan bebas basa (fase air harus tidak berwarna);
- k) uji dengan PP;
- l) kocok labu pemisah dengan kuat selama 30 detik setiap kali pencucian;
- m) pindahkan larutan ke dalam labu dasar bulat berleher asah;
- n) tambahkan beberapa butir BHT dan 15 mL etanol;
- o) uapkan dengan menggunakan *vakum evaporator* dengan suhu kira-kira 45 °C hingga kering;
- p) larutkan residu dengan campuran sikloheksan-n-heptan (1:1);
- q) pindahkan ke dalam labu ukur 2 mL;
- r) bilas dua kali;
- s) dan encerkan sampai tanda garis;
- t) gunakan larutan ini untuk *semipreparative clean up* vitamin D;
- u) larutan tahan selama semalam pada suhu 4 sampai dengan 8 °C).

A.5.4.4 Chromatographic Semipreparative Clean Up

- a) Pengaturan Sistem
Gunakan fase gerak 1 untuk *clean-up semipreparative* dan menyeimbangkan sistem. Cek stabilitas waktu retensi dengan cara menginjeksikan larutan standar kerja vitamin D₂ dan D₃ 5 µg/mL, 2 atau 3 kali. Biasanya waktu retensi berfluktuasi kurang dari ± 1%. Apabila variasinya lebih besar, cek unit pompa, homogenitas, fase gerak, larutan yang diinjeksikan (harus bebas air), dan stabilitas temperatur. Selanjutnya ulangi penginjeksian larutan standar. Pada kondisi tersebut waktu retensi untuk vitamin D₂/D₃ sekitar 17 menit. Komposisi fase gerak dapat diubah agar sesuai dengan kualitas kolom saat digunakan. Tetapkan "*collection window*" dari waktu retensi dengan volume peak. Volume peak adalah lebar dasar, pada kondisi tersebut sekitar 3 mL. Kompleks fraksi sedemikian rupa untuk meyakinkan bahwa volume peak dikumpulkan tanpa incorporating terlalu banyak komponen pengganggu. Hal ini dapat menjadi masalah pada beberapa matriks.
- b) Kemurnian Fase Gerak
Uapkan 5 mL fase gerak 1 dengan cara yang sama seperti penguapan ekstrak contoh dan lakukan pemisahan kromatografi cair fase balik dengan sistem analisis. Bila terdapat komponen pengganggu terelusi pada waktu yang sama dengan vitamin D₂ atau vitamin D₃, uapkan setiap pelarut yang terdapat dalam fase gerak 1, analisa dengan kromatografi cair, dang anti batch yang mungkin terkontaminasi.
- c) Kromatografi
Injeksikan ekstrak contoh, dan kumpulkan fraksi vitamin D₂/D₃ dalam labu dasar bulat 50 mL. Uapkan sampai hampir kering dengan "rotary evaporator" kira-kira 45 °C. Larutkan residu dalam 0,5 mL fase gerak 3. Residu ini stabil dan dapat disimpan pada 4-8 °C selama satu molar sebelum dianalisis.
Untuk mencegah akumulasi lemak polar, cuci kolom silica pada setiap akhir pemisahan dengan fase gerak 2 selama kira-kira 15 menit.

A.5.4.5 Penetapan Secara Kromatografi

Gunakan fase gerak 3 untuk analisis secara kuantitatif dan menyeimbangkan sistem. Cek kestabilan waktu retensi dengan cara menginjeksikan larutan standar kerja vitamin D₂ dan D₃ 0,8 µg/mL, 2 atau 3 kali. Biasanya waktu retensi berfluktuasi kurang dari ± 1%. Injeksikan ekstrak contoh, dan ukurlah area peak dengan integrator atau pengolah data. Pada kondisi ini, waktu retensi vitamin D₂ adalah kira-kira 10 menit, dan vitamin D₃

kira-kira 11 menit. Komposisi fase gerak dapat diubah agar sesuai dengan kualitas kolom saat digunakan. peak vitamin D₂ dan D₃ harus bebas dari komponen pengganggu seperti ditetapkan dengan teknik perbandingan panjang gelombang (misalnya 265:285 nm) atau pengamatan spektral, dan harus mempunyai nilai resolusi $R_s \geq 1,5$.

A.5.5 Perhitungan

Kandungan Vitamin D₃ (µg/g) dalam contoh dapat dihitung dengan rumus:

$$Cs = \frac{AD_3 \times mD_2 \times 100}{AD_2 \times ms \times F}$$

Keterangan :

Cs adalah konsentrasi contoh, dinyatakan dalam µg/100 g;
 AD₂ adalah area vitamin D₂;
 AD₃ adalah area vitamin D₃;
 mD₂ adalah bobot vitamin D₂ yang ditambahkan ke dalam cuplikan contoh, dinyatakan dalam mikrogram (µg);
 ms adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 F adalah faktor respon (D₃/D₂) pada panjang gelombang 265 nm.

Tetapkan faktor respon F dengan kromatografi cair fase balik, sesuai A.5.4.5. Gunakan larutan standar kerja vitamin D₂ dan D₃ 0,8 µg/ml. Hitung F dengan rumus sebagai berikut:

$$F = (\text{peak area } D_3 / \text{peak area } D_2) \times cD_2 / cD_3$$

Keterangan :

cD₂ adalah konsentrasi vitamin larutan standar D₂;
 cD₃ adalah konsentrasi vitamin larutan standar D₃.

A.5.6. Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil kandungan Vitamin D. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Cemarkan logam

A.6.1 Timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

A.6.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.6.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan *Flame* atau tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;

- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 sampai dengan 25 μm .

A.6.1.3 Perekasi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam klorida, HCl pekat;
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- g) Larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL; 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.
- h) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- i) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- j) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- k) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.

A.6.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa (W);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling, jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol polipropilen;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

A.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.1.6 Ketelitian

Kisaran *Relative Standard Deviation* (RSD) dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6.2 Timah (Sn)**A.6.2.1 Prinsip**

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.6.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;

- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur berskala 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.6.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- c) Asam klorida, HCl pekat;
- d) Larutan baku 1 000 mg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku kerja Sn.
Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 mg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.6.2.4 Cara Kerja

- a) Timbang contoh 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6.3 Merkuri (Hg)**A.6.3.1 Prinsip**

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.6.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

A.6.3.3 Bahan dan Pereaksi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 tambahkan mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.

- i) Larutan baku 1 000 µg/mL Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl₂ dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 µg/mL Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1 000 µg/mL Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 µg/mL.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL Hg; dan
- l) Batu didih.

A.6.3.4 Cara kerja

A.6.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H₂SO₄ 9 M, 20 mL HNO₃ 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO₃ : HClO₄ (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.6.3.4.2 Destruksi menggunakan microwave digester atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;

- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran

A.6.3.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemarkan arsen (As)

A.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.7.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) *Microwave digester*;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Pemanas listrik;
- f) *Burner* atau bunsen;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) Labu terbuat dari borosiklat berdasar bulat 50 mL.
- i) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 mL;
- k) Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;

- m) Cawan porselen kapasitas 50 mL; dan
- n) Gelas piala 200 mL.

A.7.3 Perekasi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- c) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- d) Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- f) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis ke dalam labu ukur 500 mL.
- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.7.4 Cara kerja

A.7.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;

- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangian setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.7.4.2 Destruksi menggunakan microwave digester atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam microwave digester dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau bunsen serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.7.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemarkan mikroba

A.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total

A.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.8.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca analitik kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.8.1.3 Larutan pengencer untuk Angka Lempeng Total

Buffered peptone water (BPW)

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.8.1.4 Homogenisasi contoh untuk ALT

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.8.2 Angka lempeng total**A.8.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.8.2.2 Peralatan

- a) Inkubator $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

A.8.2.3 Pembenihan dan pengencer

- a) Buffered peptone water (BPW)

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

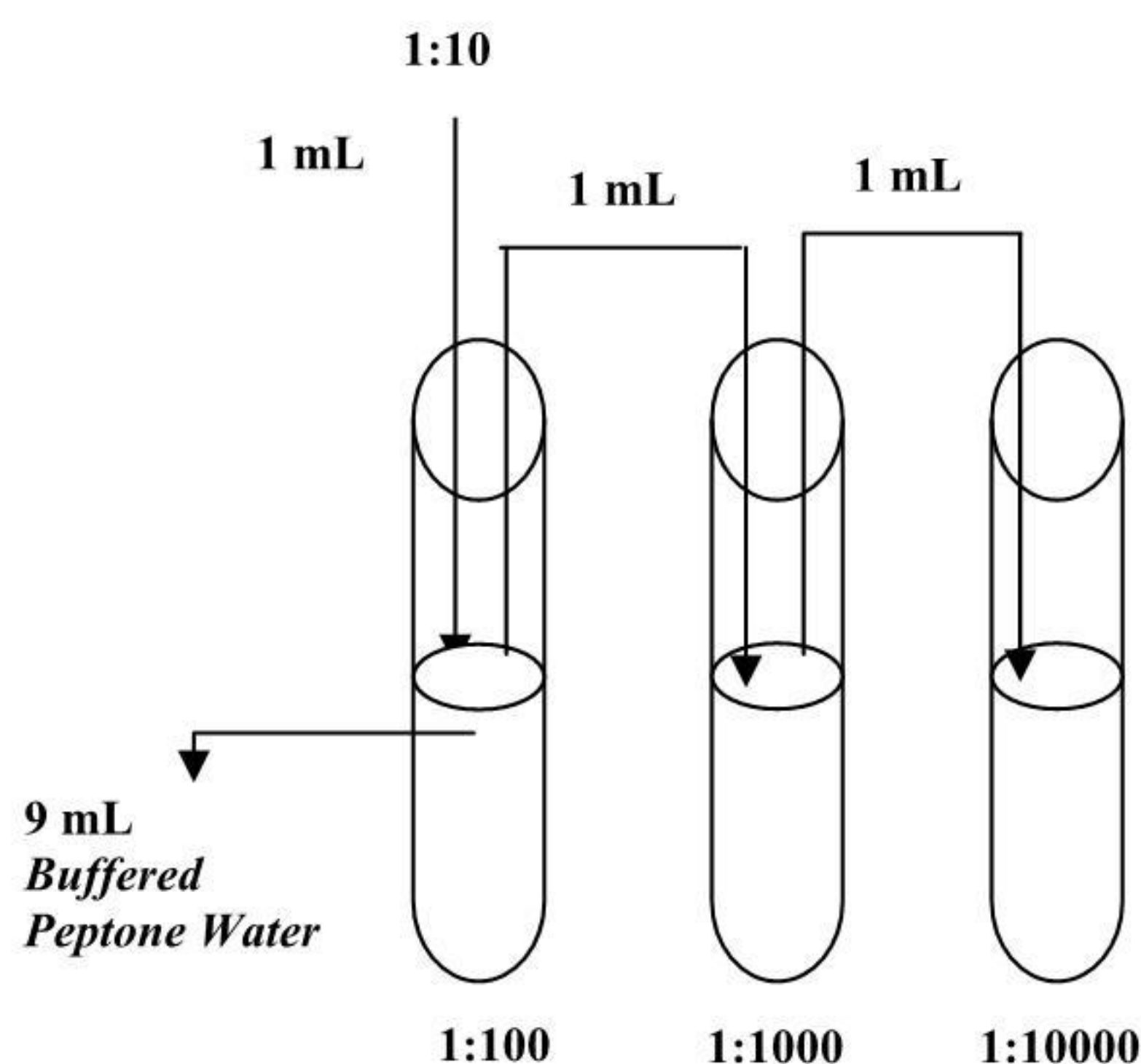
- b) Plate count agar (PCA)

- Yeast extract	2,5 g
- Pancreatic digest of caseine	5 g
- Glukosa	1 g
- Agar	15 sampai dengan 20 g
- Air suling	1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.8.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW).

- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran 10^{-1} – 10^{-4} atau sesuai keperluan ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram dan inkubasikan pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

A.8.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mL (koloni/mL);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.8.2.6 Pernyataan hasil

A.8.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;
 n_1 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
– jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembedahan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembedahan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

- g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah (<10).

A.8.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.8.3 *Salmonella* sp.

A.8.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pra pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media pengkayaan, dan kemudian dilanjutkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.8.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (37 ± 1) °C;
- b) Otoklaf;
- c) Oven;
- d) Neraca, kapasitas 2000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- e) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- f) Penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- g) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($41,5 \pm 1$) °C;
- h) Penangas air bersuhu (37 ± 1) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;

- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.8.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RVS) (media RVS harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut). Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTTn) *broth*;
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) Urea agar;
- i) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- j) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- k) Toluene;
- l) Kertas cakram, β -galaktosidase;
- m) Media *Voges-Proskauer* (VP);
- n) Pereaksi uji *Voges-Proskauer* (VP);
- o) Larutan *creatine*;
- p) 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40%;
- r) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- s) Pereaksi Kovacs;
- t) *Semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) *antiserum*; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

A.8.3.4 Cara Kerja

A.8.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (18 ± 2) jam.

A.8.3.4.2 Pengkayaan

- a) Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media *RVS* dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *MKTTn broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan

- b) inkubasikan media RVS pada suhu $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam dalam penangas air bersirkulasi dan MKTTn *broth* pada $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam.

A.8.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan MKTTn *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RVS;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 3) jam pada suhu $37 ^\circ\text{C}$;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 3) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 3) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
 - XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
 - HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 - BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.
Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 3) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 3) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut.

A.8.3.4.4 Uji penegasan

A.8.3.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan

- a) Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- b) goreskan masing-masing koloni tersebut pada cawan yang berisi NA yang akan ditumbuhkan oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- c) gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

A.8.3.4.4.2 Uji penegasan biokimia

- a) Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;
- b) inkubasi agar miring TSI pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut:

- bagian tegak:	
kuning	glukosa positif
merah atau tak berubah warna	glukosa negatif
hitam	pembentukan H_2S
gelembung atau retak	pembentukan gas dari glukosa

- permukaan agar miring:

kuning	laktosa dan/atau sukrosa positif
merah atau tak berubah warna	laktosa dan sukrosa negatif
- 90% kasus tipikal *Salmonella* positif membentuk gelembung gas dan H₂S (warna hitam);
- c) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dari A.8.3.4.4.1 dan inokulasikan ke dalam media Urea agar dengan cara menggores agar miring;
- d) inkubasikan agar miring urea pada suhu (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam, dan amati setiap interval waktu tertentu. Pada Urea agar, reaksi positif ditunjukkan dengan reaksi pemecahan urea yang menghasilkan ammonia akan menunjukkan perubahan warna *phenol red* menjadi merah mawar hingga merah muda dan kemudian akan semakin pekat. Reaksi akan muncul setelah 2 jam sampai dengan 4 jam;
- e) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.8.3.4.4.1 ke dalam media LDB, kemudian inkubasikan pada (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam, reaksi positif pada LDB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan dan warna ungu setelah inkubasi. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
- f) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.8.3.4.4.1 ke dalam tabung yang berisi 0,25 mL larutan *physiological saline* steril;
- g) tambahkan 1 tetes toluene dan kocok tabung. Tempatkan tabung pada penangas air bersuhu 37 °C dan diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan 1 lembar kertas cakram β- galaktosidase dan kocok hingga rata;
- h) inkubasikan tabung pada penangas air 37 °C dan diamkan selama (24 ± 3) jam, amati tabung pada interval waktu tertentu. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Reaksi muncul setelah 20 menit;
- i) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.8.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi 3 mL media VP, kemudian inkubasikan pada suhu (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam;
- j) setelah inkubasi tambahkan dua tetes larutan *creatine*, tiga tetes larutan 1-*naphthol* yang dilarutkan dengan etanol, dan dua tetes larutan KOH 40%, kemudian kocok setelah penambahan tiap pereaksi tersebut. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah terang setelah 15 menit;
- k) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.8.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi media TB, kemudian inkubasikan pada suhu (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam; dan
- l) setelah inkubasi tambahkan 1 mL pereaksi Kovacs. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah, sedangkan pembentukan cincin berwarna kuning menunjukkan reaksi negatif.

A.8.3.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

Interpretasi hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel A.1

Tabel A.1 – Interpretasi hasil uji biokimia

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi</i> A		<i>S. paratyphi</i> B		<i>S. paratyphi</i> C		Galur lain	
	Reaksi	% ^a	Reaksi	% ^a	Reaksi	% ^b	Reaksi	% ^b	Reaksi	% ^a
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- ^c	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H ₂ S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi β -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 ^d
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1
CATATAN: ^a Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe <i>Salmonella</i> menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari <i>food poisoning serotype</i> dari lokasi yang berbeda ^b Persentase tidak diketahui dari literatur ^c <i>Salmonella Typhi</i> bersifat anaerogenik ^d <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i> memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada β -galactosidase.										

A.8.3.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh dari A.8.3.4.4.1 dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

A.8.3.4.4.4.1 Penghilangan galur auto-aglutinasi

- Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85% pada gelas objek yang bersih;
- suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.8.3.4.4.1 sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- goyangkan gelas objek selama 30 sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

A.8.3.4.4.2 Uji antigen O-

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* O- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi pengumpalan;
 negatif : tidak terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 non spesifik : terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.8.3.4.4.3 Uji antiserum Vi-

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum Vi- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* Vi- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi pengumpalan;
 negatif : tidak terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 non spesifik : terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.8.3.4.4.4 Uji antigen H-

- Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;
- inkubasikan media pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* H- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi pengumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi pengumpalan;

negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *salin*.

A.8.3.4.4.5 Interpretasi hasil uji penegasan

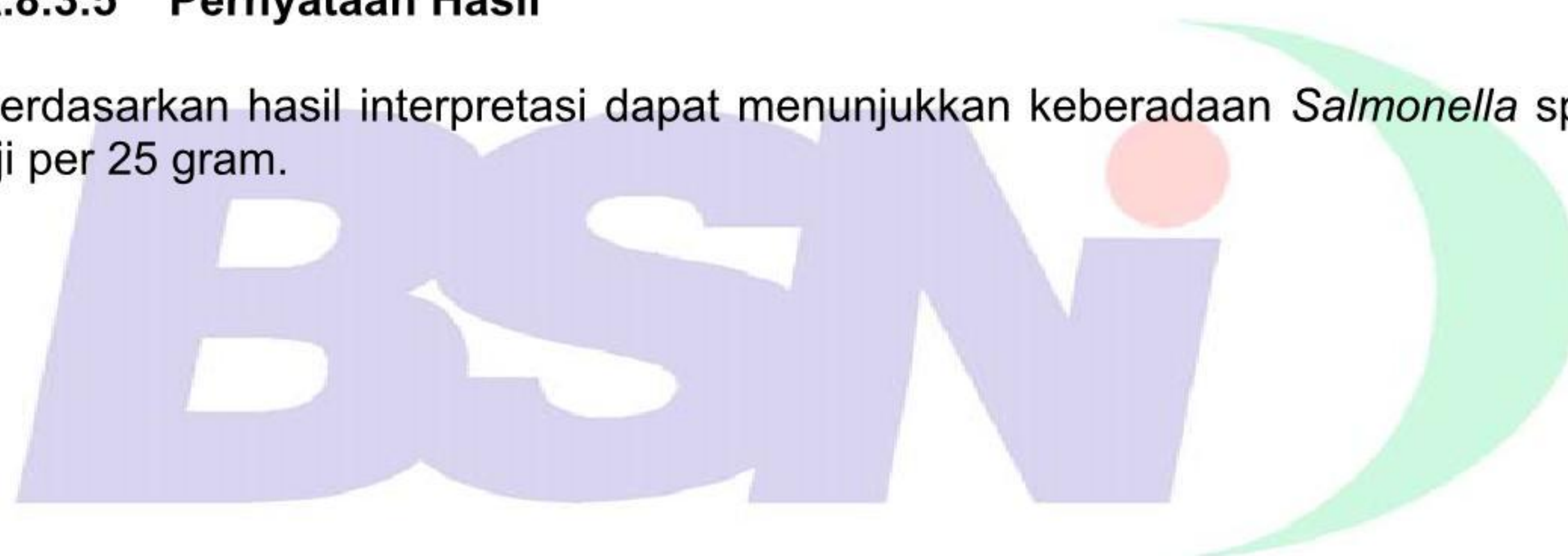
Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.2.

Tabel A.2 – Interpretasi hasil uji penegasan

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	Bukan <i>Salmonella</i>

A.8.3.5 Pernyataan Hasil

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* sp. pada contoh uji per 25 gram.



Bibliografi

- American Oil Chemists' Society. 2009. *AOCS Official Method Ca 2c-25, Moisture and Volatile Matter Air Oven Method*. AOCS Press.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 2002.05, Cholecalciferol (Vitamin D₃) in Selected Foods, Liquid Chromatography*, 18th Edition, Chapter 45.1.22A.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 938.06, Fat in Butter*, 18th Edition, Chapter 33.6.04.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 2001.13, Vitamin A (Retinol) in Foods, Liquid Chromatography*, 18th Edition, Chapter 45.1.34
- ISO 6579: 2002, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.* 4th Edition.
- ISO 4833:2003). *Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30°C*.
- SNI 7387 : 2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan*.
- SNI 7388 : 2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan*.